

# Undersøkelse av *Clostridium perfringens* i drikkevann i Norge

Av Colin Charnock

Colin Charnock er dr. philos og ansatt i Aquateam Norsk vannteknologisk senter AS

## Sammendrag

Undersøkelse av *Clostridium perfringens* i drikkevann i Norge. Rådet i EU vedtok i november 1998 et nytt direktiv ("Council Directive 98/83/1EC") for drikkevann. Direktivet omfatter overvåking av *Clostridium perfringens* (*C. p*) i vann som kommer fra eller er påvirket av overflatevann. Om *C. p* påvises i drikkevann skal kilden undersøkes for å være sikker på at det ikke er fare for helse i form av patogener, for eksempel parasitter. Det skal også gjøres tiltak for å bringe drikkevannet overensstemmelse med direktivet. *C. p* endosporer er ekstremt resistente overfor miljøpåvirkning og vannbehandling. De er derfor godt egnet til påvisning av historisk fekalforurensing og som mål på vannbehandlingens effektivitet. *C. p* er foreslått som surrogat for påvisning/fjerning av overlevelsesdyktige patogener (parasitter/virus). Denne undersøkelsen omfatter testing for *C. p* i råvann og rentvann fra 19 vannverk i Norge. Det ble påvist et lavt antall *C. p* i noen rentvannsprøver. Dette er i strid med direktivet, men de helsemessige

konsekvensene av et fåtall *C. p* i norske vannforekomster er ukjent. Undersøkelse av en mulig korrelasjon med vannbårne parasitter og virus er ønskelig. *C. p* ble effektivt fjernet av fullrenseprosesser og direkte filtrering. Filtrering uten kjemisk felling og/eller klorering var ikke tilstrekkelig til å fjerne alle *C. p*. Flere vekstmedier som er selektive for *C. p* ble testet ut. mCP medium ga best utbytte og selektivitet.

## Summary

According to the EU directive for drinking water passed in November 1998, *Clostridium perfringens* (*C. p*) should not be present in drinking water derived from, or influenced by, surface water. This study reports the presence of *C. p* in low numbers in some drinking water supplies. The health significance of the findings are difficult to judge, and work aimed at correlating the presence of *C. p* to water-borne pathogens is desirable. *C. p* is removed by extensive, physical water treatments but not by simple treatments or chlorination.

## Innledning

Denne rapporten ser på *Clostridium perfringens* (*C. p*) i drikkevann i Norge. Den vurderer testmetoder og gjengir mine erfaringer med testing for *C. p* i drikkevann. Betydningen av funn av *C. p* i drikkevann blir diskutert.

En grunn til at bruk av *C. p* som indikatorbakterie ikke er blitt utbredt har vært mangelen på en pålitelig og anvendelig metode for spesifikk påvisning. EU har laget et kort forslag (2 sider) til testing basert på membranfiltrering og dyrking på mCP medium (Bisson and Cabelli, 1979). Implementering av testing basert på en kvalitets-sikret metode er dermed ikke mulig på nåværende tidspunkt.

Undersøkelsen er finansiert med økonomisk bidrag fra i alt 19 vannverk,

## Bakgrunn

Rådet i EU vedtok i november 1998 et nytt direktiv ("Council Directive 98/83/EC") for drikkevann. Direktivet setter fokus på forholdet mellom vannkvalitet og helserisiko og innebærer noen vesentlige forandringer mht drikkevanns mikrobiologiske kvalitet. Parametrene er delt inn i tre grupper i annekset I. Gruppene A og C inneholder mikrobiologiske parametre. Krav til at vannet også skal være fritt for parasitter og virus som kan være en potensiell fare for menneskelig helse, kommer fram i direktivets generelle bestemmelser gitt i artikkel 4.

Gruppe C har 18 indikatorparametre hvorav en omfatter testing for *C. p* i vann som kommer fra eller er påvirket

av overflatevann. Dette berører dermed norsk vannforsyning i stor grad. Parametrene i gruppe C skal fastsettes kun for overvåkingsformål, men her skal det også gjøres tiltak for å bringe drikkevannet i overensstemmelse med verdiene, dersom en eller flere av dem overskrides (Folkehelsa, 1999). Det skal foretas revisjonskontroll som omfatter alle parametre samt regulærkontroll som omfatter bl. a. *C. p*.

*C. p* er foreslått som indikatorbakterie fordi den nesten utelukkende er av fekal opprinnelse (Cabelli, 1977; Bisson and Cabelli, 1980). Testing erstatter dermed testing for sulfittreducerende klostridier generelt som kan ha ulike opphav. *C. p* kan formere seg i mat og føre til ødeleggelse av næringsmidler og til matforgiftning hos mennesker. *C. p* danner endosporer. Endosporer er ekstremt resistente overfor miljøpåvirkning og vannbehandling. De er derfor godt egnet til påvisning av historisk fekalforurensning (Bisson and Cabelli, 1980) og som mål på effektivitet av vannbehandlingen. Antallet sporer av *C. p* i et sediment holdt seg konstant i over et år etter at kloakk-utslipp opphørte (Hill et al., 1996).

Direktivet slår fast at om *C. p* påvises i drikkevann skal kilden undersøkes for å være sikker på at det ikke er fare for helse i form av patogener. Parasitten *Cryptosporidium* nevnes direkte. Testing for *C. p* kan brukes som surrogat for fjerning/inaktivisering av andre overlevelsesdyktige mikrober, for eksempel vannbårne parasitter og virus (Payment and Franco, 1993; Venczel et al., 1997). Testing for *C. p* kan dermed

ha relevans for de generelle bestemmelsene om parasitter/virus gitt i artikkel 4. I skrivende stund er det ingen regelmessig og systematisk overvåking av parasitter eller virus i norske vannforekomster. Et mulig samsvar med *C. p* er ikke undersøkt.

## **Materialer og metoder**

### **Prøvetaking og transport**

Prøver ble tatt av vannverkets personell i følge en tilsendt prøvetakingsprosedyre. KMail (KM Lab, Linköping) ble benyttet for prøvetaking og forsendelse. Prøvene ble tappet til kanten på sterile plastflasker spesielt beregnet for mikrobiologisk analyse. Flaskene var på forhånd tilsatt natriumtiosulfatløsning for å oppnå en sluttkonsentrasjon på 18 mg/L i prøven. Flaskene ble returnert til laboratoriet i tilhørende KMail esker med postens bedriftspakke ekspress, slik at analysene kunne settes i gang innen 30 t. KMail inneholder kjøle-elementer slik at alle prøver holdt en temperatur på ca 8-10 °C ved ankomst til laboratoriet

### **Membranfiltrering**

Filtreringsutstyret ble grundig vasket med varmt springvann og skylt minst 5 ganger med Milli Q vann (Millipore Bedford, MA), før sterilisering i et UV-kabinett. Grundig vasking er nødvendig, fordi springvann kan inneholde sporer av sulfitt reduserende klostridier som ikke blir inaktivert av UV-lys. Analysen ble utført i følge prosedyren gitt i NS-4790 del 4 (NSF, 1989). Prøvevolumet var 100 mL for drikkevann og 2 x 20 mL for råvann.

To type membranfiltere med Ø 47 mm og porestørrelse 0,2 µm ble benyttet. Disse var Supor® 200 (Gelman-Sciences, Ann Arbor, MI) og Polycarbonat GTTP membraner (Milipore, MA). Fordi GTTP membraner er tynne ble det brukt en Supor® 200 membran som underlag i filtersatsen.

### **Vekstmedier**

Tre faste vekstmedier spesifikke for *C. p* ble testet: TSC (Harmon et al., 1971) med eggeplomme, SFP (Shahidi og Ferguson, 1971) med eggeplomme og mCP agar (Bisson og Cabelli, 1979). mCP medium er ikke kommersielt tilgjengelig. TSC og SFP var laget fra samme basal-medium, Perfringens Agar Base (CM 587, Oxoid, Bas. UK). TSC inneholdt 400 mgL<sup>-1</sup> D-cycloserine (Oxoid, selective supplement SR88) og SFP inneholdt 12 mgL<sup>-1</sup> kanamycin sulfat og 30,000 IU polymyxin B sulfat (Oxoid, selective supplement SR99). Selektive agens i mCP er 400 mgL<sup>-1</sup> D-cycloserine og 25 mg polymyxin B sulfat (Sigma-Aldrich)

Type-stammen *C. perfringens* ATCC 13124 (TCS Microbiology, Bucks, UK) ble brukt som positiv kontroll.

### **Inkubering**

Etter filtrering ble membranene umiddelbart overført til kulturskåler med et selektivt vekstmedium og inkubert anaerobt i en CO<sub>2</sub>-anriket atmosfære generert med AnaeroGen™ poser (Oxoid) i en kolbe (AN025A, Oxoid). Kulturskålene ble inkubert ved 37±1 °C i 24±3 t.

## Identifikasjon av kolonier av presumptiv *C. p*

For TSC og SFP mediene brukes sodium metabissulfitt og jern ammonium citrat i basalmediet som indikator på sulfitt-reduksjon. Typiske kolonier av *C. p* er sorte, og 1-3 mm i diameter (presumptiv *C. p*). Noen få kolonier var sorte med en lysere periferi. Disse ble også registrert som presumptiv *C. p*.

mCP-mediet inkorporerer 3 *in situ* konfirmeringstester: sukrose fermentering (Su<sup>+</sup>), ingen fermentering av cellobiose (Cello<sup>-</sup>), og produksjon av sur-fosfatase (Fos<sup>+</sup>). Presumptiv identifikasjon har 2 trinn: Su<sup>+</sup>, Cello<sup>-</sup> kolonier som vokser på mCP identifiseres som gul-hvite kolonier, 1-3 mm i diameter. Disse noteres. Blå-grønne og lilla kolonier ses bort fra (Bisson og Cabelli, 1979). Fos<sup>+</sup> aktivitet fremheves ved å utsette skålen for ammoniakk-damp i 20-30 s (Bisson og cabelli, 1979). Kolonier av presumptive *C. p* er gul/hvite kolonier og blir rosa/røde etter kontakt med ammoniakkdamp. Jeg fant det mest håndterlig å bruke et par dråper ammoniakk-løsning i lokket på petri-skålen. Arbeidet bør foregå i avtrekkskap. Den rosa fargen forsvant etter hvert men kunne bringes tilbake ved omeksponering. Dette er derimot ikke anbefalt om koloniene skal konfirmeres videre.

### Konfirmering

Minst 5, eller alle om kun 5-10, kolonier av presumptive *C. p* ble konfirmert. Konfirmeringstestene ble utført i følge NMKL metode 95, 3. utg. (NMKL,

1995) som er standard-metode benyttet i Norge for undersøkelse av næringsmidler. Disse var i korte trekk: produksjon av syre og gass i laktose-buljong (+,+), ubevegelighet i et halv-flytende vekstmedium (-) og dobbelt hemolyse etter dyrking anaerobt på blodagar ( $\beta$ h).

Tilleggsinformasjon kom fra cellenes utseende i våtpreparater - *C. p* er stavformede (noe variasjon i størrelse), ubevegelige bakterier som sjelden danner sporer i vanlige vekstmedier (Cato et al., 1986). Rundt koloniene på TSC og SFP medier kunne en som regel se en opak sone 2-4 mm i diameter forårsaket av lecithinase aktivitet. Sonen var bare synlig med polykarbonat GTTP-membraner som er tynne og halvgjenomsiktige.

## Resultater og diskusjon

Tabell 1 gir en oppsummering av resultatene. I alt deltok 19 vannverk med prøver. Det er viktig å presisere at tallene inkluderer både sporer og vegetative celler. Metoden foreslått av EU nevner ikke pasteurisering av prøvene og parameteren er oppgitt som *Clostridium perfringens* (including spores). Testing for sulfittreduserende klostrider som er påkrevd i den nåværende drikkevannforskriften baserer seg på sporetelling.

Presumptive *C. p* ble funnet i 8 (av 20) råvannsprøver og ble bekreftet i 6 av disse. Av et totalt antall av 32 presumptive kolonier (alle medie-typer), var bare 14 (44%) konfirmert som *C. p*. Det ble aldri funnet flere enn 5 presumptive *C. p* i en enkel prøveporsjon på 20 mL.

**Tabell 1. Clostridium perfringens i råvann og rentvann**

Prøve		Presumptive <i>C. perfringens</i>			Antall. konfirmert			Konfirmering: β-hemolyse, syre, gass, bevegelighet*			% <i>C. perfringens</i>			Dato
		TSC	SFP	mCP	TSC	SFP	mCP	TSC	SFP	mCP	TSC	SFP	mCP	
Tavlåa	råvann	0/0	1/0	1/0		1	1		B	A		0	100	27.05
	rentvann	0	0	0										
Frevar	råvann	1/3	0	0				A,C,D(2)			25			27.05
	rentvann	0	0	0										
Baterød	råvann	3/2	3/2	3/2	5	5	5	A(3),B,E	A,B(2),E,F	A(5)	60	20	100	27.05
	rentvann	0	0	0										
Gopledal	råvann	0/0	0/1	0/0		1			A					09.06
	rentvann	2	1	0	2	1		A(2)	E		100	0		
VIV	råvann	0/0	0/0	0/0										09.06
	rentvann	0	0	1			1		A				100	
Kran KM-lab	råvann	0	0	1			1		B				0	09.06
	rentvann	0	0	1			1		B				0	
Vansjø	råvann	1/0	5	1/0	1/0	5	1	F	B,C,F,G(2)	A	0	0	100	09.06
	rentvann	0	0	0										
Gjøvik	råvann	1/0	0/0	0/0	1			B			0			09.06
	rentvann	1	0	0	1			C			0			
"Svartvatnet"	råvann	0/0	0/0	0/0										11.06
Espeland	rentvann	0	0	1					A				100	11.06
Kurlat-Jørn**	råvann	0/0	0/0	0/0										11.06
Maridals-Vannet	20 mL	0	0	0										11.06
Bamble	råvann	0/0	0/0	1/0			1		A				100	23.06
	rentvann	1	0	0	1			E			0			
Skadberg	råvann	0/0	0/0	0/0										23.06
	rentvann	0	0	1			1		B				0	
Feset	råvann	0/0	0/0	0/0										23.06
	rentvann	0	4	0		4			B(2),D(2)		0			
Valleråsen, Bærsvann, Vikelvdal, Finnsnes, Kismul, Åste, Skjelbreia, Sandstangen		Ingen presumptive <i>C. p</i> i råvann/rentvann												
Østensjø-vannet	20 mL	12	21	7	ND	8	ND	ND	A(4),B(3),H	ND	ND	50	ND	27.05
Bekk	100 mL	88	ND	13	ND	ND	4			A(4)			100	27.05
Akerselva	20 mL	110/118	120/129	91/85	5	5	7	?,+,-(5)	?,+,-(4)	?,+,-(6)	100	80	86	10.05
								?,+,-(1)	?,+,-(1)	?,-,-(1)				
Sogns-Vann	100 mL	96	87/97	98	5	5	6	?,+,-(5)	?,+,-(4)	?,+,-(6)	100	80	100	10.05
								?,-,-(1)	?,-,-(1)					

\* Råvannskilder som forsyner Espeland vannverk

? vekst på blodagar ble ikke undersøkt

# (A = βH, +, +, - (konfirmert *C. p*); B = -, +, +, -; C = βH, -, -, -; D = -, -, -, -; E = -, -, -, +;

F = -, +, +, G = βH, -, -, +; H = -, +, -, -)

17 av 19 rentvannsprøver ble det funnet presumptive *C. p. C. p* ble konfirmert i 3 av disse. Av totalt 12 presumptive kolonier av *C. p* (alle medie-typer) ble bare 4 (33%) konfirmert som *C. p*. Det ble aldri funnet flere enn 2 presumptive *C. p* i en enkel prøveportasjon på 100 mL.

### Medium selektivitet

TSC: totalt ble 15 presumptive *C. p* telt. Av disse ble 6 (40%) konfirmert som *C. p*. Det var 6 forskjellige kombinasjoner av konfirmeringstester.

SFP: totalt ble 17 presumptive *C. p* telt. Av disse ble 2 (12%) konfirmert som *C. p*.

Det var 7 forskjellige kombinasjoner av konfirmeringstester.

mCP: totalt ble 11 presumptive *C. p* telt. Av disse ble 10 (91 %) konfirmert som *C. p*. Det var bare 2 forskjellige kombinasjoner av konfirmeringstester.

Resultatene i tabell 1 viser at TSC både var mer selektivt enn SFP og ga et større utbytte av *C. p*. Dette er i overensstemmelse med tidligere forskning (Harmon et al., 1971). mCP ga et høyere utbytte og var betydelig mer selektivt for *C. p* enn de andre mediene. Selektiviteten på 91% var lik det (93%) som er rapportert av Bisson og Cabelli (1979). Østensjøvannet ble brukt som miljøkontroll. 8 kolonier på mCP ble konfirmert. Av disse var 4 (50%) *C. p*. En liten bekk som renner ut i Østensjøvannet ble også testet. 4 kolonier av presumtiv *C. p* på mCP var konfirmert (100%). Et par preliminnære forsøk ga et høyt antall presumtive *C. p* i vann fra Akerselva (flere kilometer nedstrøms for Maridalsvannet) og Sognsvann. Alle kolonier på TSC og nesten alle på mCP var bekreftet (uten blodagar) som *C. p*. Med forbehold om at vekst på blod agar ikke ble undersøkt, kan resultatene forklares med at andelen *C. p* øker med økt kontaminering med fekal materiale. Dette er diskutert senere.

Det var sjeldent at vesentlig bakgrunnsvekst oppsto på mCP. På TSC og spesielt SFP var det ofte hvit bakgrunnsvekst. Kombinasjonen av antibiotika i mCP er sannsynligvis mer selektiv enn den i SFP og TSC.

Antallet *C. p* i råvanns- og rentvannsprøvene var meget lavt. Prøver tatt fra

vann som er sterkt påvirket av kommunalt avløp har flere og en høyere prosentandel konfirmerte *C. p* på TSC (og sulfitt-jern agar) enn det registrert i denne rapporten (Sartory 1986; Hellenes og Mære, 1981). Vannforekomster som ikke mottar fekal materiale eller som bare mottar avsig fra landbruk eller beiting, kan vise nesten ingen *C. p* (Fujioka og Shizumura, 1985; Sorensen et al., 1989). Dette er sannsynligvis fordi *C. p* er mer tallrik (2-5 logtall) i avføring fra mennesker enn fra mange dyrarter (Sorensen et al., 1989). Alle (untatt 1) prøvene som ble analysert i denne undersøkelsen kommer fra innsjøer/tjern, eller er grunnvann (Sandstangen, Åstø). Slike kilder er vanligvis mindre utsatt for kommunalt avløp enn f.eks. elver. Beskyttelse av nedbørsfeltet fra ferdsel av dyr og landbruk vil opprettholde kvaliteten. Det høyeste antallet *C. p* i denne rapporten ble påvist i elva Glomma som forsyner Baterød vannverk. Til og med i denne prøven ble det ikke funnet flere enn 3 *C. p* per 20 mL. Fujioka og Shizumura (1985) fant 0-46 *C. p* pr. 100 mL i elver som ikke mottok avløpsvann. Elver som var påvirket av kommunalt avløp viste 56-2100 *C. p* pr 100 mL.

Betydningen av de få *C. p* som er påvist i denne studien er vanskelig å tolke. Det må tas i betraktning at *C. p* endosporer er utbredt i naturen i jord og sedimenter (Cato et al., 1986). Mer forskning må til før vannkvaliteten og hygieniske forhold kan bedømmes mht tilstedeværelse av noen få *C. p*.

Hemolyse på blodagar var den mest differensierende av tilleggstestene. Selv

om  $\beta$ -hemolyse alltid kunne ses etter inkubering i 24 t kom den ytre ufullstendige hemolysen ofte til syne etter 2 døgn. Det kan dermed være nødvendig å reinkubere prøvene i ytterligere et døgn. NMKL No. 95 3. utg. er noe vag m.h.t hvilken vekt hemolyse-forhold skal tillegges i konfirmasjon. Testen er vist til som "tilleggsinformasjon". I sin forgjenger NMKL No. 95, 2. utg. (NMKL, 1986) er flere egenskaper hos *C. p* undersøkt, men ikke hemolyse-forholdene. Konfirmeringsopplegget refereres til som 2 rør/4 testprosedyren (bevegelighet, nitratreduksjon, laktose fermentering og gelatin-hydrolyse). I tillegg er sporefarging og lecithinose reaksjonen nevnt. Sartory (1986) og Mead et al., (1981) konfirmerer kolonier fra TSC basert på de samme testene. Det er ikke plass her til å diskutere de relative ytelsene til tilleggstestene. Men det bør poengteres at i denne undersøkelsen var det som oftest hemolyse-reaksjonen på blodagar alene som skilte presumptive og konfirmerte *C. p*. Hemolyse-negative og svakt hemolytiske *C. p* finnes. *C. p* som gir ingen eller veldig lite hemolyse forekommer ofte i kliniske isolater (McClane, 1999 personlig opplysning). På grunn av dette er andre konfirmeringstester blitt foretrukket. At noen av de presumptive *C. p* i denne studien kan være ikke-hemolytiske isolater kan dermed ikke utelukkes. Basert på antallet referanser i litteraturen bør kanskje "2 rør/4 tester" prosedyren foretrekkes.

En hensikt med utvikling av mCP var å gjøre mediet så spesifikt som mulig

for å slippe subkulturering og tilleggstester (Bisson og Cabelli, 1979). Det er vanlig at mCP anvendes uten konfirmeringstester (Sorensen et al., 1989; Payment og Franco, 1993; Hill et al., 1996). Bisson og Cabelli kvalitetssikret mCP ved å konfirmere kolonier av presumptive *C. p* med 15 tilleggstester. Konfirmeringsprosenten var 93%. Dette synes å være godt nok for EU som ikke nevner konfirmeringstester. I denne studien ble 91% av rosa kolonier på mCP konfirmert som *C. p* i følge NMKL 95, 3 utg. I alle tilfeller var det bare hemolyse-reaksjonen som skilte presumptive fra konfirmerte *C. p*. Dette betyr at også rentvann fra Skadberg vannverk og kranvann i KM Labs lokaler inneholder *C. p* etter EUs målestokk (tabell 1).

Det er vanlig å koble kvalitetskrav direkte mot en navngitt standardmetode. Påvisning og til en viss grad identifikasjon er metode-betinget. Denne koblingen gjør saken enkel med tanke på godkjenning eller ikke. Hensikten med indikatorparametre er å avsløre helsefarlige forhold og valgte analyser må stå i tråd med hensikten. Før innføring av nye parametre kreves grundig forskning og valideringsstudier av relevant materiale. De aller fleste undersøkelser av *C. p* er av sterkt kloakk-påvirkede kilder som ikke brukes til drikkevannsframstilling. Det finnes lite informasjon om betydningen av et lite antall *C. p* i råvann brukt til framstilling av drikkevann eller i selve drikkevannet.

### **Valg av vekstmedier**

mCP-medium var vesentlig mer selek-

tivt enn TSC og SFP for *C. p.* Dette er i overrenstemmelse med tidligere forskning (Burger et al., 1984; Sartory et al., 1998). At TSC mangler selektivitet er blitt rapportert før (Harmon et al., 1971; Burger et al., 1984). Burger et al., (1984) fant at så få som 24-26% av koloniene på TSC var *C. p.* (cf 40% i denne studien). Derimot har Sartory (1986) rapportert at over 90% av koloniene på TSC var *C. p.* I herværende studie ga mCP større utbytte av *C. p.* enn de andre mediene. Dette er i motsetning til flere tidligere rapporter (Burger et al., 1984; Sartory et al., 1998; Sartory, 1986) En forklaring på dette kan være det lave antallet prøver som er undersøkt. Sartory (1986) fikk omtrent like mye selektivitet med TSC (eggeplomme-fritt) som med mCP og enda større utbytte. Forfatteren konkluderte med at eggeplomme-fritt TSC er mer egnet til rutine overvåking av vann enn mCP.

mCP er kostbart å lage. Indoksy- $\beta$ -D-glukosid koster for eksempel 2500 NOK for 500 mg. Dette er nok til å lage 0,8 L medium. Mediet kan ikke kjøpes ferdig laget og krever avtrekkskap. Perfringens agar base som er basalt medium i TSC og SFP koster rundt 1000 NOK for 500 g. Dette er nok til å lage 10 L. De selektive supplementene som må til for å lage 10 L koster mellom 1000-3000 NOK. Derimot vil bruk av TSC og SFP nødvendiggjøre bruk av konfirmeringstester og resultatene vil først foreligge 48t etter analysen med mCP. Dette vil også innebære flere medier og økt arbeidstid. I og med at så få *C. p.* er tilstede i drikkevann kan

alle kolonier konfirmeres. Det viktigste kan da være å bruke det mediet som gir størst utbytte. Direktivet slår fast at andre metoder enn de som er spesifisert kan brukes om det foreligger dokumentasjon på at de er like pålitelige. Det kan hende at flere enn en godkjent standard-metode til slutt vil foreligge i regi av standardiseringsforbundene (for eksempel ISO).

En hensikt med denne undersøkelsen var å se om NMKL 95, 3. utg. kunne anvendes til testing for *C. p.* i drikkevann. Derfor ble inkubasjonstemperaturen 37 °C valgt. Derimot kan mer selektivitet sannsynligvis oppnås ved å bruke 44,5-45 °C (Hauschild og Holdemann, 1974; Sartory, 1986) som er nærmere det optimale for *C. p.* (Cato et al., 1986). Også bruk av eggeplomme-fritt TSC og SFP synes å være mer selektivt for *C. p.* (Harmon, 1976). Men som nevnt kan alle presumptive isolater som regel konfirmeres. Da vil lecithinase-aktivitet (lett synlig gjennom polykarbonat membraner) på eggeplomme-agar gi nyttig tilleggsinformasjon. Det er rapportert at over 95% av *C. p.* isolater har lecithinase aktivitet (Cato et al., 1986).

### **Fjerning av *C. p.* i vannbehandling**

I følge EU direktivet skal det ikke finnes *C. p.* i 100 mL prøve. Det er da viktig å vurdere renseprosesser mht komplett fjerning av spesielt sporer av *C. p.* Om formeringsdyktige *C. p.* fjernes under vannbehandling er sjansene for at parsitter/enterovirus forsvinner også forhøyet. Tabell 2 gir en oversikt over hovedprinsippene i vannbehandling hos



**Tabell 2. Fjerning av *Clostridium perfringens* som funksjon av vannbehandling**

Vannverk	Presumptiv <i>C. p</i> i råvannet?	Presumptiv <i>C p</i> i rentvannet?	Stikkord i vannbehandling
Tavlaa	Ja ( <i>C. p</i> ) <sup>#</sup>	Nei	Klorering, Direktefiltrering
FREVAR	Ja ( <i>C. p</i> )	Nei	Klorering, Fullrenseanlegg
Baterød	Ja ( <i>C. p</i> )	Nei	Klorering, Fullrenseanlegg
Gopledal	Ja ( <i>C. p</i> )	Ja ( <i>C. p</i> )	Klorering
VIV	Nei	Ja ( <i>C. p</i> )	Klorering, Sandfilter
Oset	Nei	Ja	Klorering
Vansjø	Ja ( <i>C. p</i> )	Nei	Klorering, Direkte filtrering
Gjøvik	Ja	Ja	Klorering, alkaliske filtere
Espeland	-	Ja ( <i>C. p</i> )	Sandfilter
"Svartavatnet"	Nei	-	-
"Kurlatjørn"	Nei	-	-
Bamble	Ja ( <i>C. p</i> )	Ja	Klorering
Skadberg	Nei	Ja	Klorering, Marmorfiltrering
Feset	Nei	Ja	Membranfiltrering
Valleråsen	Nei	Nei	Klorering Direkte filtrering
Bærvann	Nei	Nei	Membranfiltrering
Vikelvdal	Nei	Nei	Filtrering gjennom marmormasse
Finnsnes	Nei	Nei	UV-bestråling
Åstø	Nei	Nei	Marmorfilter
Skjelbreia	Nei	Nei	Membranfiltrering
Sandstangen	Nei	Nei	Sandfiltrering
Kismul	Nei	Nei	Klorering Direkte filtrering

\* Råvannskilde som forsyner Espeland vannverk

# (*C. p*) betyr at presumtive kolonier ble konfirmert som *C. p* gjennom tilleggstester (tabell 1)

de deltagende vannverk samt testresultatene.

Antallet påviste *C. p* var ikke høyt nok til å trekke konklusjoner om prosentreduksjoner som en konsekvens av vannbehandling. Det er derimot tre klare trender i dataene:

1) Vannverk som bruker fullrensing eller direkte filtrering produserer

rentvann som ikke viser tegn til *C. p*. I en tidligere studie kunne ikke *C. p* påvises i en oppkonsentrert prøve av 1000 L drikkevann etter en fullrenseprosess (Payment og Franco, 1993).

(2) Filtrering alene er ikke tilstrekkelig til å fjerne alle *C.p*. Filtrering (spesielt sandfiltrering) kan gi en

betydelig reduksjon i *C. p* men fjerner ikke alle (Sorensen et al., 1989; Payment og Franco, 1993).

- (3) Klorering (i mengdene brukt i Norge; ca 0,5 mg klor/L) inaktiverer ikke *C. p*. Dette er fordi sporene er relativt klorresistente. Fujioka og Shizumans (1983) fant at antallet sporer var senket med bare 1 log enhet etter klorering. En reduksjon av 1,4 log enheter ble oppnådd etter 4 t med 5 mg klor/L (Veneczel et al., 1997). I det samme forsøket ble ingen *Cryptosporidium* inaktivisert selv etter 24 t kontaktid.

I et par tilfeller ble *C. p* påvist i rentvannet men ikke i råvannet hos vannverk med enkel behandling. Dette kan forklares med at det ble undersøkt et større prøvevolum for rentvann. Det mest overraskende var at *C. p* ble påvist i rentvann fra Fesetanlegget etter membranfiltrering. Denne analysen bør gjentas samt at det bør analyses prøver fra andre membranfilteringsanlegg. En hovedkonklusjon av denne rapporten er at omfattende vannbehandling må til for å fjerne *C. parfringens*.

### **Hva betyr resultatene for helsemessige forhold og i forvaltnings-sammenheng?**

Det nye drikkevannsdirektivet må gjennom behandling i EFTA og i EØS-komiteen før det kan gjøres gjeldende for Norge. Denne behandlingen er ikke nært forestående (Folkehelsa, 1999). EU-direktivet slår fast at om *C. p* påvi-

ses i drikkevann må saken undersøkes og tiltak settes i gang for å bringe drikkevannet i overensstemmelse med direktivet. Vannverk som benytter seg av siling og klorering kommer ikke til å fjerne desinfeksjonsresistente sporer. Blir disse da pålagt å innføre tiltak – for eksempel mer omfattende behandling – for å fjerne bakteriene? Direktivet sier at om ikke vannkvaliteten tilfredstiller verdiene i tabell C (indikatorparametre) skal det vurderes om overskridelsen volder en trussel for menneskers helse. Tiltak skal settes i gang hvor dette er nødvendig. Jeg tolker dette slik at det er vurderingen av faren som i første omgang er pålagt. Dessuten fastsetter den nåværende drikkevannforskriften at det ikke skal forekomme sulfittreducerende klostridier i drikkevann.

Om *C. p* kommer seg over hygieniske barrierer er mulighetene tilstede for at parasitter og entero-virus også gjør det. *Cryptosporidium* er blitt påvist i flere norske råvannskilder (Gjerde, 1998). Undersøkelse av bruk av *C. p* som surrogat for påvisning/fjerning av parasitter er ønskelig i tråd med intensjonen i artikkel 4 i direktivet (se innledning).

Sykdom forårsaket av *C. p* er primært assosiert med formering av arten i næringsmidler. Jeg har ikke funnet resultater som viser at drikkevann har vært en direkte årsak til helserelaterte problemer forbundet med *C. p*. Matforgiftning og andre *C. p* relaterte problemer skyldes som oftest inntak av mat som inneholder flere millioner *C. p* pr. gram. Bruk av *C. p* infisert vann i næringsmiddelproduksjon og behandling kan

ha konsekvenser. Infisert vann vil i prinsippet volde en potensiell helsefare som vil avhenge av behandling/produksjon av produktet og spesielt dets bruk hos konsumenten.

## Referanser

- Bisson, J.W. and Cabelli, V.J. 1979: Membrane filter enumeration method for *Clostridium perfringens*. Appl. Environ. Microbiol. 37: 55-66.
- Bisson, J.W. and Cabelli, V.J. 1980: *Clostridium perfringens* as a water pollution indicator. J. Wat. Pollut. Control Fed 52:241-248.
- Burger, J.S., Nupen, E.M. and Grabow, W.O.K. 1984: Evaluation of four growth media for membrane filtration counting of *Clostridium perfringens* in water. Wat. SA 10: 185-188.
- Cabelli, V.J. 1977: *Clostridium perfringens* as a water quality indicator. Special Technical Publ. 635. American society for testing of materials, Philadelphia.
- Cato, E.P., George, W.L. and Finegold, S.M. (1986): The genus *Clostridium*, pp. 1141-1200. In: H.A. Sneath, N.S. Mair, M.E. Sharpe and J.G. Holt (ed.), Bergey's manual of systematic bacteriology, vol. 2. The Williams and Wilkins Co., Baltimore
- Folkehelsa. 1999: Nytt EU-direktiv. Kommunal Teknikk. 6/99: 24-25.
- Fujioka, R.S. and Shizumura, L.K. 1985: *Clostridium perfringens*, a reliable point source indicator of stream water quality. J. Wat. Pollut. Control Fed. 57: 986-992.
- Gjerde, B. 1998: Presentasjon av prosjektet "*Cryptosporidium* og *Giardia* i drikkevasskjelder i Noreg". Vann 4: 445-448.
- Harmon, S.M. 1976: Collaborative study of an improved method for the enumeration and confirmation of *Clostridium perfringens* in foods. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 59: 606-612.
- Harmon, S.M. and Kautter, D.A. 1978: Media for confirming *Clostridium perfringens* from food and feces. J. Fd. Prot. 41: 626-630.
- Harmon, S.M., Kautter, D.A. and Peeler, J.T. 1971: Improved medium for enumeration of *Clostridium perfringens*. Appl. Microbiol. 22: 688-692.
- Hauschild, A.H.W. and Holdeman L.V. 1974: *Clostridium celatum* sp. Nov., isolated from normal human feces. Int. J. Syst. Bacteriol. 24: 478-481.
- Hellesnes, I. og Mære, B. 1981: Sulfitt-reducerende klostridier som mål på vannkvalitet. Vann 4: 395-401.
- Hill, R.T., Straube, W.L., Palmisano, A.C., Gibson, S.J. and Colwell, R.R. 1996: Distribution of sewage indicated by *Clostridium perfringens* at a deep-water disposal site after cessation of sewage disposal. Appl. Environ. Microbiol. 62(5): 1741-1746.

- McClane, B.A. Personlig opplysning, 1999.
- Mead, G.C., Paez de Leon, L. and Adams, B.W. 1981: A study of rapid and simplified confirmatory tests for *Clostridium perfringens*. J. Appl. Bact. 51: 355-361.
- Nordisk Metodikkommitte för Livsmedel (NMKL). *Clostridium perfringens* - bestemmelse i næringsmidler. NMKL Nr 95, 2 utplagan, 1985.
- Nordisk Metodikkommitte för Livsmedel (NMKL). *Clostridium perfringens* - bestemmelse i næringsmidler. NMKL Nr 95, 3. utg, 1997.
- Norges Standardiseringsforbund (NSF). Teknikker for kvantitativ bestemmelse av mikroorganismer fra vann, sedimenter og kloakkslam, membranfilterteknikk. NS 4790 del 4, 1 utg, 1989
- Payment, P. and Franco, E. 1993: *Clostridium perfringens* and somatic coliphages as indicators of the efficiency of drinking water treatment for viruses and protozoan cysts. Appl. Environ Microbiol. 59(8): 2418-2424.
- Sartory, D.P. 1986: Membrane filtration enumeration of faecal clostridia and *Clostridium perfringens* in water. Wat. Res. 20: 1255-1260.
- Sartory, D.P., Field, M., Curbishley, S.M. and Pritchard, A.M. 1998: Evaluation of two media for the membrane filtration enumeration of *Clostridium perfringens* from water. Lett. Appl. Microbiol. 27: 323-327.
- Shahidi, S.A. and Ferguson, K.R. 1971: New quantitative, qualitative, and confirmatory media for rapid analysis of food for *Clostridium perfringens*. Appl. Environ. Microbiol. 21: 500-506.
- Sorensen, D.L. Eberl, S.G. and Dicksa, R.A. 1989: *Clostridium perfringens* as a point source indicator in non-point polluted streams. Wat. Res. 23: 191-197
- Venczel, L.V., Arrowood, M., Hurd, M. and Sobsey, I.V.I.D. 1997: Inactivation of *Cryptosporidium parvum* oocysts and *Clostridium perfringens* spores by a mixed oxidant disinfectant and by free chlorine. Appl. Environ. Microbiol. 63: 1598-1601

## Takk til

Takk til vannverkene som har bidratt økonomisk til gjennomføring av undersøkelsen,

Takk til Steinar Bergseth og Hilde Kjølberg for kritisk gjennomlesing av manuskriptet. Takk også til Nerliens for gratis levering av Oxoid medier til uttesting.